

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
2 octobre 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/079785 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : A01N 43/16(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR03/00969

(22) Date de dépôt international : 27 mars 2003 (27.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/03849 27 mars 2002 (27.03.2002) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris  
CEDEX 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LIENART, Yvette, Janine [FR/FR]; St Nizier d'Uriage, F-38410 Uriage (FR). HEYRAUD, Alain, Charles, Abel [FR/FR]; 6, côte du Verdaret, F-38113 Veuret-Voroize (FR).

(74) Mandataire : DEMACHY, Charles; Grosset-Fournier &amp; Demachy SARL, 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**A1** (54) Title: USE OF COMPOUNDS COMPRISING A POLYSACCHARIDE STRUCTURE AS BIOFERTILISER AND PHYTOSANITARY PRODUCTS

**WO 03/079785** (54) Titre : UTILISATION DE COMPOSÉS COMPRENANT UNE STRUCTURE OSIDIQUE EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET BIOFERTILISANTS

(57) Abstract: The invention relates to the use of a compound comprising a polysaccharide structure having formula XFG, or a derivative structure, in relation to adapting plants to abiotic stress, controlling flowering and fructification and inducing defence reactions against pathogens.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet l'utilisation d'un composé comprenant une structure osidique de formule XFG, ou une structure dérivée, dans le cadre de l'adaptation des plantes à un stress abiotique, le contrôle de la floraison, le contrôle de la fructification, et l'induction de réactions de défense contre les pathogènes.

## UTILISATION DE COMPOSES COMPRENANT UNE STRUCTURE OSIDIQUE CONTENANT X, F, ET G, ET DE COMPOSES DERIVES, EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET BIOFERTILISANTS

5

La présente invention a pour objet de nouvelles utilisations de 'composés comprenant une structure osidique contenant des enchaînements X, F et G, ainsi que de composés dérivés, dans le domaine phytosanitaire, et celui de la biofertilisation.

Les parois cellulaires des fruits et des végétaux sont formés de polysaccharides, dont principalement la pectine, la cellulose et le xyloglucane qui intervient dans la mise en place des parois (Levy S et al., Plant J. 1997, 11(3) : 373-86). Le xyloglucane se retrouve également en grande quantité dans l'endosperme des graines des Dicotylédones.

Le xyloglucane est un polymère de 1,4- $\beta$ -glucane substitué différemment selon son origine. Chez les Dicotylédones, les substitutions des chaînes linéaires de 1,4  $\beta$ -D-glucane impliquent le plus souvent des ramifications de type 1,6  $\alpha$ -D-xylosyl, ou 1,6  $\alpha$ -D-xylose 1,2  $\beta$ -D-galactosyl, et du fucose peut être associé, en position terminale, au galactose, soit une ramification latérale de type 1,6  $\alpha$ -D-xylose 1,2  $\beta$ -D-galactose 1,2  $\alpha$ -L-fucosyl. Toujours chez les Dicotylédones, le résidu fucose est absent de l'endosperme, et il peut être remplacé par le résidu  $\alpha$ -L-arabinose, par exemple chez certaines Solanacées. Le xyloglucane des Monocotylédones diffère de celui des Dicotylédones par un taux plus faible de substitution par les résidus xylose, galactose et par l'absence de fucose. Le xyloglucane forme avec les microfibres de cellulose des structures pontées qui constituent l'ossature et assurent la flexibilité de la paroi cellulaire des végétaux (Pauly M, Albersheim P, Darvill A, York WS (1999) Plant J, 20 (6): 629-39).

Le xyloglucane est un substrat d'endoxyloglucanases (Vincken JP, Beldman G, Voragen AG Carbohydr Res (1997) 13, 298(4):299-310) ou de xyloglucane endotransglycosylase (Steele NM, Fry SC, Biochem J (1999) 15, 340, 1, 207-211), à savoir d'activités enzymatiques aptes à modifier la structure des parois cellulaires au cours de l'elongation cellulaire, en période de germination, de fructification par exemple et qui sont dépendantes d'hormones notamment d'auxines (Hetherington PR et Fry S.

(1993) *Plant Physiology*, 103, 987-992), et de gibberellines (MacLachlan G et Brady C (1994) *Plant Physiol* 105, 965-974).

Le xyloglucane, en particulier un oligomère fucosylé, le nonasaccharide XXFG (décrit dans Fry et al. (1993) *Physiologia Plantarum*, 89, 1-3), est bien connu pour son effet antiauxinique (Mac Dougall CJ et Fry SC (1989) *Plant Physiol* 89, 883-887). A l'opposé, des oligomères sans fucose mais avec du galactose comme les oligomères XXLG et XLLG ont un effet auxinique (Mc Dougall GJ et Fry SC (1990) *Plant Physiology* 93, 1042-1048).

Par ailleurs, de nombreux signaux génèrent des espèces activées d'oxygène (on parle également de "burst oxydatif"). Des espèces activées d'oxygène sont bien connues pour être libérées au cours des interactions plante-pathogène. Des oligosaccharides de diverse origine (acide polygalacturonique, chitosane, O-glycans ..) ont été répertoriés pour leur capacité à générer un burst oxydatif (Low PS et Heinstein PF (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 472-479; Rogers KR., Albert F, et Anderson AJ (1988) *Plant Physiol* 86, 547-553; Apostol I, Heinstein PF et Low PS (1989) *Plant Physiol* 90, 109-116; Vera-Estrella R, Blumwald E et Higgins VJ (1992) *Plant Physiol.* 1208-1215; Bolwell GP, Butt VS, Davies DR et Zimmerlin A. (1995) *Free Rad. Res. Comm.* 23, 517-532 ; Orozco-Cardenas M et Ryan CA (1999) *PNAS*, 25, 96, 11, 6553-655; Nita-Lazar M, Iwahara S, Takegawa K, Liénart Y (2000) *J Plant Physiol.* 156, 306-311). Les enzymes NAD(P)H oxydo-reductases pour la libération d'anion superoxyde (Van Gestelen PV, Asard A, Caubergs RJ (1997) *Plant Physiol* 115, 543-550) et peroxydases pour la formation de peroxyde ou d'anion superoxyde ou de radicaux OH, sont impliquées (Baker CJ et Orlandi EW (1995) *Ann. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321; Chen SX et Schopfer P (1999) *Eur Bioch* 260, 726- 735). D'autres signaux (acide salicylique, jasmonates, cGMP, NO...) génèrent aussi un burst (Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, Klessig DF (1995) *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 4134-4137; Voros K, Feussner I, Kuhn H, Lee J, Graner A, Lobler M, Parthier B, Wasternack C *Eur J Biochem* (1998) 15, 251, 36-44; Durner J, et Klessig J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10328-10333; Durner D et Klessig DF (1999) *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 369-374).

Des conditions extrêmes d'environnement (sécheresse, froid, UV, salinité...) déclenchent le même effet.

Le rôle majeur de  $H_2O_2$  dans la génération du burst comme dans la régulation du stress oxydant repose :

- sur sa formation par dismutation à partir de l'anion superoxyde (Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK et Murphy TM (1998) *Plant Physiol* 116, 1379-1385),

- sur son utilisation dans des séquences du métabolisme des acides gras C<sub>18</sub> (pour la peroxydation de lipides (Koch E, Meier BM, Eiben H-G, Slusarenko A (1992) *Plant Physiol* 99, 571-576) ou pour la synthèse d'octadécanoïdes et de leurs dérivés dont certains comme les méthyl-jasmonates sont des métabolites à fonction hormonale,

- sur sa fonction de substrat pour des enzyme peroxydase et catalase, propriété limitant l'accumulation de peroxyde toxique pour la cellule (Baker CJ, Harmon GL, Glazener JA et Orlandi EW (1995) *Plant Physiol*, 108, 353-359).

Les espèces activées d'oxygène, l'anion superoxyde en particulier, contrôlent différentes voies métaboliques. Elles interviennent dans :

- la biosynthèse des polyamines : des monoamines sont oxydées en aldéhydes avec production de NH<sub>3</sub> et de peroxyde. L'oxydation de la L-arginine par la nitrite-synthase aboutit à la formation d'un précurseur de polyamine (L-citrulline),

- la synthèse de l'éthylène,

- la synthèse des gibberellines. Plus de 20 oxydases sont impliquées dans la régulation de la biosynthèse des gibberellines.

Les espèces activées d'oxygène interviennent dans des étapes de transduction de signaux, parce qu'elles sont associées à l'activité de liaison de récepteurs ou à l'activité d'enzymes de transduction (Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K et Scheel D (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4800-4805; Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10328-10333).

Elles interviennent dans la régulation du potentiel redox cellulaire par l'intermédiaire des groupements thiols (conversion GSSG-GSH, cystine-cystéine, etc..). A ce titre, elles contrôlent des processus de sénescence qui se manifestent à certaines phases de la floraison et de fructification dans différents organes.

Le burst oxydatif interfère avec le métabolisme hormonal, le potentiel le plus performant pour réguler les stades de floraison et de fructification (en particulier leur déclenchement et leur durée sont programmés par une balance hormonale (rapport auxine/cytokinine par exemple), et les espèces activées d'oxygène, dont le peroxyde, contrôlent la synthèse des polyamines).

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que les composés comprenant une structure osidique de formule XFG, ainsi que des composés dérivés de ces derniers, ont un effet de stimulation de l'enzyme glutathion réductase, de l'enzyme phospholipase D chez les plantes, ainsi que des glycosylhydrolases.

En stimulant l'enzyme glutathion réductase, les composés de l'invention déclenchent des réactions d'adaptation à tout stress oxydant, comme le froid en particulier, en limitant les effets toxiques des espèces activées d'oxygène (Allen RD, Webb RP, Schake SA (1997) Free Radic Biol Med, 23 (3):473-479; O'Kane D, Gill V, Boyd P, Burdon R (1996) Planta, 198 (3):371-377), et ils régulent le potentiel redox de la cellule, ce qui modifie l'activité d'enzymes ou de protéines thiol-dépendantes, phospholipase D, thiol-protéases et inhibiteurs de thiol-protéases en particulier (Taher MM, Mahgoub MA, Abd-Elfattah (1998) AS Biochem Mol Biol Int 46 3, 619-28), ainsi que par un effet d'induction d'un inhibiteur de protéase thiol-dépendante, et ce sans pour autant activer en cascade d'autres systèmes enzymatiques dans des proportions néfastes pour la plante.

En stimulant l'activité phospholipase D, les composés de l'invention amplifient l'effet hormonal de l'acide abscissique dans la mesure où l'activation de l'enzyme conduit à la production d'acide phosphatidique (qui mime les effets de l'acide abscissique). A ce titre, ils peuvent révéler un antagonisme contre les gibberellines, l'éthylène ou les jasmonates (Grill E., Himmelbach A. (1998) Current Opinion in Plant Biology, 1, 1, 5, 412-418; Ritchie S, Gilroy S (1998) Plant Biology, 95, 5, 3, 2697-2702; Moons A, Prinsen E, Bauw G, Van Montagu M (1997) Plant Cell 9 12, 2243-59).

Actuellement, en dehors des engrains chimiques, le contrôle du développement des végétaux repose principalement sur :

- l'utilisation de compositions agricoles enrichies en oligo-éléments, en composants nitrate, phosphate, et potassium, en polyamines ou en certaines hormones,
- l'utilisation de micro-organismes, naturels ou génétiquement modifiés, qui améliorent la qualité du sol, favorisent la croissance des végétaux ou accroissent le rendement des cultures ; il s'agit notamment des rhizobiacées comme *R. meliloti* et *B. japonicum*, des bactéries fixatrices d'azote libre, comme *Bacillus* et *Pseudomonas*, et des champignons comme *Penicillium*,
- le développement de plantes transgéniques. Cette technologie se heurte à des problèmes législatifs et à une forte opposition de la part des consommateurs; de plus,

elle n'a pas encore abouti à des applications satisfaisantes dans le secteur des biofertilisants.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouvelles compositions utilisables dans le domaine phytosanitaire et de la biofertilisation, et plus particulièrement pour lutter contre le stress abiotique chez les plantes, et contrôler la floraison et la fructification.

La présente invention a pour objet l'utilisation de composés comprenant :

- un ou deux enchaînements X, à savoir un enchaînement  $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- D-Glucopyranose, ou  $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- D-Glucopyranose, ou une forme réduite de X, encore désignée Xol,

- un ou deux enchaînements F, à savoir un enchaînement  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- D-Glucopyranose, ou un enchaînement  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- D-Glucopyranose , ou une forme réduite de F, encore désignée Fol,

- et au moins un enchaînement G, à savoir une unité  $\beta$ -D-glucopyranosyl ou D-Glucopyranose, substituée ou non en position 4, ou une forme réduite de G, encore désignée Gol,

lesdits enchaînements X, F, et G étant liés les uns aux autres dans un ordre aléatoire, et comportent, le cas échéant, les modifications suivantes : (i) modification de groupements hydroxyle, à savoir des dérivés acétylés ou méthoxylés ou acylés, dont le résidu glucose en position terminale est réduit ou non, (ii) modification de l'unité terminale réductrice, telle que par amination réductrice, (iii) oxydation, en position 6 des résidus Gal et Glc accessibles,

lesdits composés ayant la propriété de :

- stimuler la glutathion réductase,
- et/ou de stimuler la phospholipase D chez les plantes,
- et/ou de stimuler des glycosylhydrolases,

dans le cadre d'applications liées aux propriétés susmentionnées desdits composés, à savoir :

- l'adaptation des plantes à un stress abiotique, tel que l'adaptation au froid, ou à un stress hydrique tel que la sécheresse, l'humidité ou la salinité,
- le contrôle de la floraison,
- le contrôle de la fructification,

5 - l'induction de réactions de défense contre les pathogènes tels que les bactéries, virus, champignons.

à l'exclusion de l'utilisation susmentionnée du composé de formule XXFG.

Par contrôle de la floraison, on entend plus particulièrement le contrôle des phases clefs du processus de floraison comme l'antheresis (Wang M, Hoekstra S, van Bergen S, Lamers GE, Oppedijk BJ, Heijden MW, de Priester W, Schilperoort RA (1999) *Plant Mol Biol* 39, 3:489-501), ou le développement des boutons floraux (Lim CO, Lee SI, Chung WS, Park SH, Hwang I, Cho MJ (1996), *Plant Mol Biol*, 30, 2, 373-379), comme les phases d'induction ou d'abscission florale (Colasanti J, Sundaresan V (2000) *Trends Biochem Sci*, 25, 5, 236-240).

15 Par contrôle de la fructification, on entend plus particulièrement le contrôle du déclenchement et/ou de la durée de la phase de maturation (Fan L, Zheng S, Wang X (1997) *Plant Cell*, 9, 12, 2183-9; Ryan SN, Laing WA, Mc Canus MT (1998), *Phytochemistry*, 49, 4, 957-963), le contrôle du métabolisme des parois cellulaires en rapport avec l'accumulation des sucres et des phénols (Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thevenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S (1999) *Plant Physiol* 120 (4):1083-94), et le contrôle de l'abscission des feuilles et des fruits (Gomez-Cadenas A, Mehouachi J, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (2000), *Planta*, 210, 4, 636-643).

20 L'induction de réactions de défense contre les pathogènes est en rapport avec l'élicitation de PR-protéines, en particulier des enzymes 1,3- $\beta$ -D glucanase et endochitinase aussi connues pour intervenir aussi dans le développement des plantes (Munch-Garthoff S, Neuhaus JM, Boller T, Kemmerling B, Kogel KH (1997) *Planta* 201, 2, 235-44 ; Buchter R, Stromberg A, Schmelzer E, Kombrink E (1997) *Plant Mol Biol* 35, 6, 749-61; Robinson SP, Jacobs AK, Dry IB (1997) *Plant Physiol* 114, 3, 771-8).

30 Le contrôle de remaniements métaboliques et cataboliques dont certains tissus sont l'objet en période de différenciation ou de sénescence, est en rapport avec l'élicitation des enzymes 1,4- $\beta$ -D-glucanase et  $\beta$ -D-xylosidase (Trainotti L, Spolaore S,

Ferrarese L, Casadoro G (1997) Plant Mol Biol 34 (5):791-802; Kalaitzis P, Hong SB, Solomos T, Tucker ML (1999) Plant Cell Physiol 40(8), 905-8).

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés définis ci-dessus, correspondant à des dérivés acétylés choisis parmi :

5 - les formes mono-acétylées en position 2 ou 3 ou 4 pour le xylose, ou en position 3 ou 4 ou 6 pour le galactose, ou en position 2 ou 3 ou 4 ou 6 pour le glucose, ou en position 2 ou 3 ou 4 pour le fucose,

10 - les formes di-acétylées en position 2 et 3, 2 et 4, 3 et 4, 2 et 6, 3 et 6, ou 4 et 6 pour le glucose, ou en position 2 et 3, 2 et 4, ou 3 et 4 pour le xylose, ou en position 3 et 4, 3 et 6, ou 4 et 6 pour le galactose, ou en position 2 et 3, 2 et 4, ou 3 et 4 pour le fucose, ou toute combinaison prenant en compte deux sucres monoacétylés constitutifs de la molécule,

15 - les formes tri-acétylées en position 2, 3 et 4 pour le xylose, ou en position 2, 3 et 4, ou 2, 3, et 6 pour le glucose, ou en position 3, 4, et 6 pour le galactose, ou en position 2, 3, et 4 pour le fucose, ou toute combinaison prenant en compte trois sucres monoacétylés ou un sucre mono-acétylé et un sucre di-acétylé constitutifs de la molécule,

- les formes tétra-acétylées à totalement acétylées, ou toutes combinaisons des différents sucres acétylés ou non constitutifs de la molécule.

20 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, de composés dans lesquels les oses sont des résidus glycosyl (L) ou (D), le cas échéant sous forme réduite, et/ou sous forme  $\alpha$  ou  $\beta$ , le cas échéant sous forme pyranose ou furanose, et sont liés entre eux par des liaisons du type  $1 \rightarrow 2$ ,  $1 \rightarrow 3$ ,  $1 \rightarrow 4$ , ou  $1 \rightarrow 6$ , et plus particulièrement du type  $\alpha 1 \rightarrow 2$  dans le cas de la liaison d'un fucose à un galactose,  $\beta 1 \rightarrow 2$  dans le cas de la liaison d'un galactose à un xylose,  $\beta 1 \rightarrow 4$ , dans le cas de la liaison d'un glucose à un glucose, ou  $\alpha 1 \rightarrow 6$ , dans le cas de la liaison d'un xylose à un glucose.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet encore, l'utilisation susmentionnée de composés comprenant une structure osidique choisie parmi celles de formules suivantes :

30

$(X)_a (F)_b (G)_c$

$(X)_a (G)_c (F)_b$

$(F)_b (X)_a (G)_c$

(F)<sub>b</sub> (G)<sub>c</sub> (X)<sub>a</sub>

(G)<sub>c</sub> (X)<sub>a</sub> (F)<sub>b</sub>

(G)<sub>c</sub> (X)<sub>a</sub> (F)<sub>b</sub>

5 dans lesquelles :

- G, X et F sont tels que définis ci-dessus,

- a, b, et c, indépendamment les uns des autres représentent 1, ou 2.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore, l'utilisation susmentionnée :

- de composés comprenant une structure osidique de formule XFG suivante :

10 Glc-Glc-Glc

  |   |

  Xyl Xyl

  |

  Gal

XFG

15           |

  Fuc

- ou de composés comprenant une structure dérivée de XFG répondant aux formules XGF, FXG, FGX, GFX, et GXF, suivantes :

20 Glc-Glc-Glc

  |   |

  Xyl Xyl

XGF

25           |

  Gal

  |

  Fuc

30 Glc-Glc-Glc

  |   |

  Xyl Xyl

FXG

  |

  Gal

  |

  Fuc

35

Glc-Glc-Glc

  |   |

  Xyl Xyl

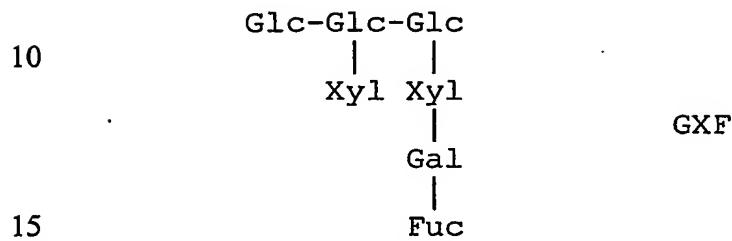
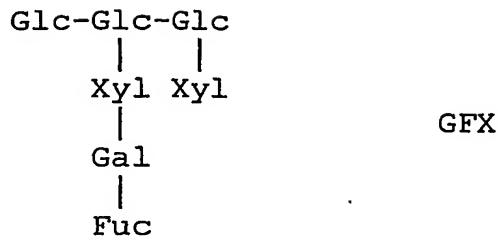
FGX

40           |

  Gal

  |

  Fuc

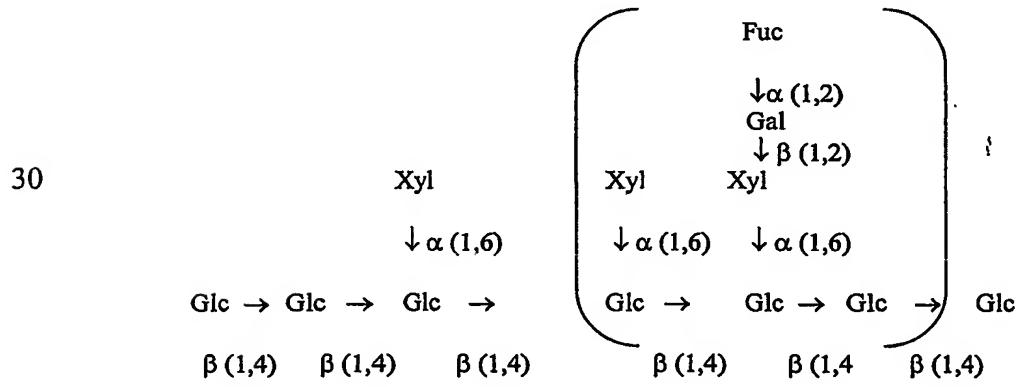


le résidu glucose en position terminale desdits composés étant réduit ou non, ou comprenant des structures dérivées par modification telles que définies ci-dessus.

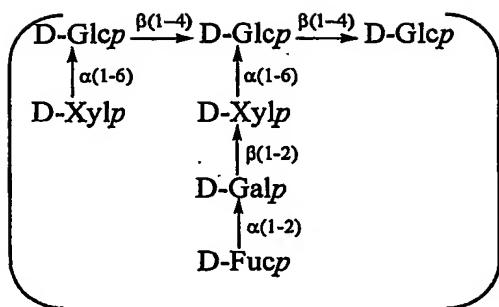
20 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de composés choisis  
parmi les suivants : XFXG, XFGX, FGXX, FXGX, FXXG, GXXF, GXFX, GFXX,  
XXGF, XGXF, XGFX.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée, du composé de formule

25



35 L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée, du composé XFG de formule



5

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de polymères ou d'oligomères comprenant à titre d'unité monomérique, des composés tels que définis ci-dessus, lesdits polymères ou oligomères comprenant entre 2 et environ 300 unités monomériques, notamment entre 2 et environ 100 unités, ou entre 2 et environ 50 unités, ou entre 2 et environ 20 unités, notamment entre 5 et 12 unités.

10

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, de polymères susmentionnés comprenant un nombre d'unités monomériques définies ci-dessus inférieur ou égal à 12, et de préférence inférieur ou égal à 5 (à savoir des polymères dont le degré de polymérisation DP est inférieur ou égal à 12, et de préférence inférieur ou égal à 5).

15

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée d'enchaînements successifs d'au moins deux unités monomériques définies ci-dessus, l'une au moins des unités desdits enchaînements étant différente de l'autre ou des autres unités.

20

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'enchaînements d'unités tels que définis ci-dessus, dans lesquels le nombre d'unités est inférieur ou égal à 12, de préférence inférieur ou égal à 5.

25

L'invention concerne également un procédé de stimulation de la glutathion réductase chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini ci-dessus, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

L'invention a également pour objet l'application du procédé de stimulation de la glutathion réductase susmentionné, à la mise en œuvre d'un procédé d'adaptation des

plantes à un stress abiotique, tel que l'adaptation au froid, ou à un stress hydrique tel que la sécheresse, l'humidité ou la salinité.

5 L'invention concerne également un procédé de stimulation de la production de la phospholipase D chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini ci-dessus, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet l'application du procédé de stimulation de la production de la phospholipase D susmentionné, à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la floraison, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle de l'induction florale, de la durée de la floraison, et de l'abscission des fleurs, et/ou à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la fructification des plantes, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle du déclenchement et de la durée de la 15 maturation des fruits, de l'abscission des feuilles et des fruits.

20 L'invention a également pour objet un procédé de stimulation de la production des glycosylhydrolases chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé tel que défini ci-dessus, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

25 L'invention concerne plus particulièrement l'application du procédé de stimulation de la production des glycosylhydrolases susmentionné, à la mise en œuvre d'un procédé d'induction de réactions de défense contre les pathogènes tels que les bactéries, virus, champignons, et/ ou de contrôle de certaines phases de développement des plantes (germination, fécondation, différenciation cellulaire au cours de la floraison ou de la fructification).

30 Avantageusement, les compositions susmentionnées comprenant au moins un composé défini ci-dessus et utilisées dans le cadre de la présente invention, se présentent en tant qu'intrant agricole sous forme solide (notamment poudre, granulés, pastilles), ou sous forme liquide (notamment en solution aqueuse), associé ou non à d'autres composants d'intrant agricole.

Parmi les plantes susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on citera principalement les plantes agronomiquement utiles, telles que la vigne, les

arbres fruitiers (notamment pommier, poirier, noyer), les céréales (notamment riz, orge), les oléagineux (notamment soja, colza, tournesol), les protéagineux (notamment les pois), et les cultures maraîchères (notamment les tomates).

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de composés définis ci-dessus, tels qu'obtenus :

- à partir de plantes, notamment par extraction de semences, feuilles, racines, fruits, en particulier à partir de pommes (*Malus malus* L., Rosaceae), notamment selon la méthode décrite dans Vincken JP, Beldman G, Niessen WMA, Voragen AGJ (1996) Carbohydrate Polymers, 29, 1, 75-85 ; Spronk BA, Rademaker GJ, Haverkamp J, Thomas-Oates JE, Vincken JP, Voragen AG, Kamerling JP, Vliegenthart JF (1997) Carbohydrate Research, 305, 2, 233-242); le procédé se déroule en 3 étapes: a) extraction du polymère xyloglucane de la biomasse par traitement alcalin suivi d'une dépectinisation par voie enzymatique; b) hydrolyse du polymère à l'aide de cellulases et plus particulièrement d'endo 1-4  $\beta$  D glucanase isolée de *Trichoderma viride*; c) purification d'oligomères par chromatographie d'exclusion sur Bio-Gel P-2 suivie d'une chromatographie d'échange d'anions sur système Dionex .

- à partir de suspensions cellulaires de plantes, notamment de . *Rubus fruticosus* L. en particulier selon Joseleau JP, Cartier N, Chambat G, Faik A, K Ruel (1992), Biochimie, 74, 81-88;

. *Rosa* sp. en particulier selon Fry SC (1989) J.Exp.Bot. 40, 1-11; Mc Dougall, G.J. Fry SC (1991) Carbohydrate Research 219, 123-132,

le procédé se déroulant en 3 étapes: a) extraction du polymère xyloglucane des parois cellulaires par traitement alcalin couplé à une dépectinisation par voie chimique ou bien par déprotéinisation couplée à un traitement alcalin; b) hydrolyse du polymère à l'aide de cellulases et plus particulièrement d'endo 1-4  $\beta$  D glucanase isolée de *Trichoderma viride*; c) purification d'oligomères par chromatographie d'exclusion sur Bio-Gel P-2 suivie d'un fractionnement par chromatographie d'échange d'anions sur système Dionex ou par chromatographie d'exclusion sur Bio-Gel P-2 suivie d'un fractionnement par chromatographie en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub> ou par échange d'anions sur système Dionex; les cellulases peuvent être des enzymes obtenues par fermentation de souches bactériennes génétiquement modifiées ou non ou obtenues par voie recombinante.

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée de composés définis ci-dessus, tels qu'obtenus :

\* par synthèse chimique, notamment selon la méthode décrite dans Pavlova ZN, Ash AO, Vnuchkova VA, Babakov AV, Torgov VI, Nechaev OA, Usov AI, Shibaev VN (1992) *Plant Science* 85, 131-134; ou sur la base des travaux de Watt D. K., Brasch D.J, Larsen D. S, Melton L. D, Simpson J *Carbohydrate Research*, 325, 2000, 300-312,

5 \* par synthèse chemoenzymatique, notamment à partir d'oligomères de xyloglucane modifiés par activité endo-transglycosylase ( $\beta$ -D-glucosidase,  $\alpha$ -( $\beta$ ) L-xylodidase,  $\beta$ -D-galactosidase) selon York W.S., Harvey L.K., Guillen R., Alberheim P., Darvill A., *Carbohydrate Research*, 1993, 248, 285-301 ou par activité endo transxyloglucanases selon G. MacLachlan, C. Brady, *Plant Physiology*, 105, 1994, 965-974) ou par activité fucosyltransférase (s) d'origine végétale ou animale selon Baydoun E. A.-H., Abdel-Massih R. m, Dani D, Rizk S, Bret C. T, *Journal of Plant Physiology*, 158, 2000, 145-150 ; Faik A, Bar Peled M, DeRocher AE, Zeng W, Perinn RM, Wilkerson C, Raikhel NV, Keegstra K *J Biol Chem*, 2000, 275,20,

10 \* par voie recombinante,

15 \* par hydrolyse du polymère xyloglucane ou à partir d'oligomères tels qu'obtenus de polymères ou de glycanes représentant la partie glycanique de glycoprotéines à partir d'une dégradation enzymatique de xyloglucanes présents dans des biomasses telles que :

20 1/ les fruits et légumes, et plus particulièrement, poivrons, tomates, pommes de terre, olives et pommes, ou de résidus issus de ces biomasses (« pomaces »...) selon les méthodes décrites dans :

25 Spronk B.A., Rademaker G.J., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Vincken J.P., Voragen A.G., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F., *Carbohydrate Research*, 305, 1997, 233-242,

Renard C.M.G.C., Lomax J.A., Boon J.J., *Carbohydrate Research*, 232, 1992, 303-320,

Vincken J.P., Beldman G., Niessen W.M.A., Voragen A.G.J., *Carbohydrate Polymers*, 29 (1996) 75-85 ;

30 2/ les suspensions cellulaires (*Rubus fruticosos*, sycomore) selon :

Joseleau J.P., Cartier N., Chambat G., Faik, A., Ruel K., *Biochimie*, 74 (1992) 81-88,

Augur C., Yu L., Ogawa T., Sinay P., Darvill A.G., Albersheim P., *Plant Physiology*, 99 (1992) 180-185 ;

3/ par fermentation de microorganismes (bactéries, champignons...) génétiquement modifiés ou non ;

4/ les graines (capucine, *Hymenaea*,...) selon McDougall G.J., ry S.C., Plant Physiology, 89 (1989) 883-887,

5 5/ les feuilles, et plus particulièrement celles d'*Hymenaea courbaril*, Busato A.P., Vargas-Rechia C.G., Reicher F., Phytochemistry, 58 (2001) 525-531,

en utilisant des enzymes qui sont :

10 . des xyloglucanases (Garcia-Garrido J.M., Rejon-Palomares A., Ocampo J.A., Garcia-Romera I., Mycol. Res., 103 (1999) 882-886),

15 . des cellulases, et plus particulièrement des endo  $\beta$ -1,4 glucanases de *Trichoderma viride* (Vincken JP., de Keiser A., Beldman G., Voragen A.G., J., Plant Physiology, 108, 1995, 1579-1585), de *Trichoderma. Reesei* (Hasper A.A., Dekkers E., van Mil M., van de Vondervoort P.J.L., de Graaff L.H., Applied and Environmental Microbiology, 68, 2002, 1556-1560) ou d'*Aspergillus oryzae* (Kato Y., Matsuda K., Agric. Biol. Chem., 44, 1980, 1759-1766),

. des exo cellulases comme celles d'*Irpea lacteum*,

lesdites enzymes étant :

20 . soit isolées de souches bactériennes ou fongiques génétiquement modifiées ou non, ou obtenues par voie recombinante (Pauly M, Andersen LN, Kaupinnen S, Kofod LV, York WS, Albersheim P, Darvill A (Glycobiology 1999, 9, 1, 93-100),

25 . utilisées seules ou en mélange associées de préférence avec des enzymes pectolytiques (polygalacturonases, pectine estérases, pectine lyases) selon Renard C.M.G.C., Searle-can Leewen M.J.F., Voragen A.G.J., Thibault J.F., Pilnik W., Carbohydrate Polymers, 14, 1991, 295-314, ou bien remplacées par des enzymes à spectre large de type pectolytique.

30 Le mélange d'oligomères obtenu par hydrolyse du polymère est fractionné en degré de polymérisation (DP) par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Bio-Gel et les oligosaccharides de DP d'intérêt sont ensuite séparés en fonction de caractéristiques structurales par chromatographie haute performance (HPLC).

Plusieurs systèmes sont susceptibles d'être utilisés parmi la chromatographie sur échangeur d'anions (HPAEC) ou sur colonne DIONEX (Vincken J.P., Beldman G., Niessen W.M.A., Voragen A.G.J., Carbohydrate Polymers, 29, 1996, 1, 75-85), et la chromatographie d'affinité sur phase normale (Kakegawa K., Edashige Y., Ishii T.,

Phytochemistry, 47, 1998, 767-771) ou phase inverse (Watt D.K., Brash D.J., Larsen D.S., Melton L.D., Carbohydrate Polymers, 39, 1999, 165-180).

La structure de chaque oligosaccharide est ensuite confirmée par des méthodes spectroscopiques (RMN et spectrométrie de masse) (York W.S., van Halbeek H., Darvill A.G., Albersheim P., Carbohydrate Research, 200, 1990, 9-31).

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du potentiel éliciteur de composés selon l'invention chez la vigne, à savoir de l'effet inducteur d'une résistance au froid

Des plants provenant de différents cépages dont le cépage *Pinot noir* sont utilisés pour l'étude. Chaque échantillon, composé de 5 plants, est traité par pulvérisation foliaire à différents stades végétatifs de l'échelle BBCN avec l'éliciteur xyloglucane : heptasaccharide XFG en solution à des doses variables ; la vaporisation de 2.5ml de solution par plante se fait à l'aide d'un vaporisateur (écart de +/- 1%).

Après l'application de l'éliciteur, les plants ont été exposés à un stress froid d'intensité et de durée variable. Après l'exposition au froid, les plants sont mis en chambre climatique à 20°C avec une alternance jour/nuit de 12h. L'aspect des feuilles est observé 24h, 72h après la sortie du froid. Les effets de froid sont évalués en observant les nécroses foliaires induites par le gel et les plantes sont conservées plusieurs mois pour suivre leur développement ultérieur.

Les résultats sur 50 plants et relatifs à 10 réplications sont exprimés par l'indice de protection  $I_f$  (%) = 100-P ; P, étant la proportion de feuilles nécrosées. Les résultats concernant les plants témoins T traités à l'eau et les plants élicités par l'heptasaccharide : XFG ou XFGol ont été exprimés par l'indice de protection  $I_f$  (%) mesuré 24h après le stress.

25

30

**Résultats :**

Cépage : Pinot noir au stade BBCH 13

Température : 3,5°C durée 180 min

	T (I <sub>f</sub> )	XFG (I <sub>f</sub> )	XFGol (I <sub>f</sub> )
dose : 33 mg/l	75	100	100
dose : 33 µg/l	75	100	100

5 Par ailleurs, on a noté que l'application de l'éliciteur :

- apporte aussi un effet de protection contre le gel sur les cépages Chenin, Chardonnay, Cabernet sauvignon, Pinot meunier, Merlot, Grolleau,
- ne change pas le développement de la vigne,
- a un effet protecteur contre le gel qui se maintient plusieurs jours.

10 Les plants traités par l'éliciteur xyloglucane à la dose de 3,3 mg/l résistent au stress froid qui détruit les feuilles des témoins traitées à l'eau : la coloration des feuilles des plants élicités reste normale au lieu de virer au vert sombre dès le dégel (comme cela s'observe pour les témoins traités à l'eau), et aucun signe de nécrose n'apparaît après 24 h comme cela s'observe pour les témoins traités à l'eau).

15 On a noté que l'application de l'éliciteur n'apporte pas de perturbation dans l'évolution de la plante étant donné que le développement des plants élicités après le stress froid est comparable à celui des plants témoins non exposés au froid.

## REVENDICATIONS

## 5           1. Utilisation de composés comprenant:

- un ou deux enchaînements X, à savoir un enchaînement  $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- D-Glucopyranose, ou  $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- D-Glucopyranose, ou une forme réduite de X, encore désignée X01,

10           - un ou deux enchaînements F, à savoir un enchaînement  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\alpha$ -D-Xylopyranosyl (1,6)- D-Glucopyranose, ou un enchaînement  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl ou  $\alpha$ -L-Fucopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl (1,2)- $\beta$ -D-Xylopyranosyl (1,4)- D-Glucopyranose , ou une forme réduite de F, encore désignée F01,

15           - et au moins un enchaînement G, à savoir une unité  $\beta$ -D-glucopyranosyl ou D-Glucopyranose, substituée ou non en position 4, ou une forme réduite de G, encore désignée G01,

20           lesdits enchaînements X, F, et G étant liés les uns aux autres dans un ordre aléatoire, et comportent, le cas échéant, les modifications suivantes : (i) par modification de groupements hydroxyle, à savoir des dérivés acétylés ou méthoxylés ou acylés, dont le résidu glucose en position terminale est réduit ou non, (ii) par modification de l'unité terminale réductrice, telle que par amination réductrice, (iii) par oxydation, en position 6 des résidus Gal et Glc accessibles,

25           lesdits composés ayant la propriété de :

- stimuler la glutathion réductase,
- et/ou de stimuler la phospholipase D chez les plantes,
- et/ou de stimuler des glycosylhydrolases,

30           dans le cadre d'applications liées aux propriétés susmentionnées desdits composés, à savoir :

- l'adaptation des plantes à un stress abiotique, tel que l'adaptation au froid, ou à un stress hydrique tel que la sécheresse, l'humidité ou la salinité,

- le contrôle de la floraison,
- le contrôle de la fructification,
- l'induction de réactions de défense contre les pathogènes tels que les bactéries, virus, champignons.

5 à l'exclusion de l'utilisation susmentionnée du composé de formule XXFG.

2. Utilisation de composés selon la revendication 1, correspondant à des dérivés acétylés choisis parmi :

10 - les formes mono-acétylées en position 2 ou 3 ou 4 pour le xylose, ou en position 3 ou 4 ou 6 pour le galactose, ou en position 2 ou 3 ou 4 ou 6 pour le glucose, ou en position 2 ou 3 ou 4 pour le fucose,

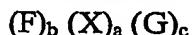
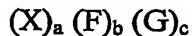
15 - les formes di-acétylées en position 2 et 3, 2 et 4, 3 et 4, 2 et 6, 3 et 6, ou 4 et 6 pour le glucose, ou en position 2 et 3, 2 et 4, ou 3 et 4 pour le xylose, ou en position 3 et 4, 3 et 6, ou 4 et 6 pour le galactose, ou en position 2 et 3, 2 et 4, ou 3 et 4 pour le fucose, ou toute combinaison prenant en compte deux sucres monoacétylés constitutifs de la molécule,

20 - les formes tri-acétylées en position 2, 3 et 4 pour le xylose, ou en position 2, 3 et 4, ou 2, 3, et 6 pour le glucose, ou en position 3, 4, et 6 pour le galactose, ou en position 2, 3, et 4 pour le fucose, ou toute combinaison prenant en compte trois sucres monoacétylés ou un sucre mono-acétylé et un sucre di-acétylé constitutifs de la molécule,

25 - les formes tétra-acétylées à totalement acétylées, ou toutes combinaisons des différents sucres acétylés ou non constitutifs de la molécule.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, de composés dans lesquels les oses sont sous forme  $\alpha$  ou  $\beta$ , le cas échéant sous forme pyranose ou furanose, et sont liés entre eux par des liaisons du type 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4, ou 1 $\rightarrow$ 6.

30 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, de composés comprenant une structure osidique choisie parmi celles de formules suivantes :



(G)<sub>c</sub> (X)<sub>a</sub> (F)<sub>b</sub>

(G)<sub>c</sub> (X)<sub>a</sub> (F)<sub>b</sub>

dans lesquelles :

5 - G, X et F sont tels que définis dans la revendication 1,  
- a, b, et c, indépendamment les uns des autres représentent 1, ou 2.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, de composés comprenant une structure osidique de formule XFG ou comprenant une structure dérivée de XFG répondant aux formules XGF, FXG, FGX, GFX, et GXF, dont le résidu glucose en position terminale est réduit ou non, ou comprenant des structures dérivées par modification telles que définies dans la revendication 1.

15 6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, de composés choisis parmi les suivants : XGXG, XFGX, FGXX, FXGX, FXXG, GXXF, GXFX, GFXX, XXGF, XGXF, XGFX.

## 7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, du composé de formule

20

Xyl

Fuc

$\downarrow\alpha(1,2)$

Gal

xv

xvi

$\downarrow g_1(1,0)$

$\downarrow \alpha(1.6) \rightarrow \downarrow \alpha(1.6)$

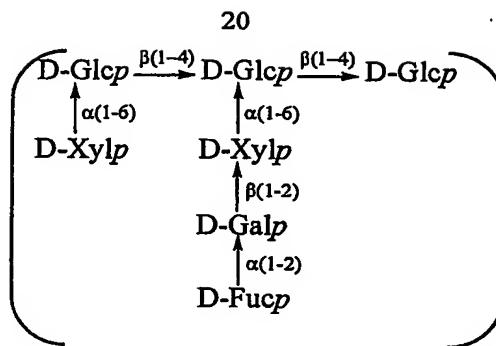
25

$$\begin{array}{ccccccc}
 \text{Glc} & \rightarrow & \text{Glc} & \rightarrow & \text{Glc} & \rightarrow & \\
 & & \beta(1,4) & & \beta(1,4) & & \beta(1,4)
 \end{array}$$

$$\begin{array}{ccccccc}
 \text{Glc} & \rightarrow & \text{Glc} & \rightarrow & \text{Glc} & \rightarrow & \text{Glc} \\
 & & \beta(1,4) & & \beta(1,4) & & \beta(1,4)
 \end{array}$$

30

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, du composé XFG de formule



5        9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, de polymères ou d'oligomères comprenant à titre d'unité monomérique, des composés tels que définis dans l'une des revendications 1 à 8, lesdits polymères ou oligomères comprenant entre 2 et environ 300 unités monomériques, notamment entre 2 et environ 100 unités, ou entre 2 et environ 50 unités, ou entre 2 et environ 20 unités, notamment entre 5 et 12 unités.

10

10. Procédé de stimulation de la glutathion réductase chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé défini dans l'une des revendications 1 à 9, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

15

20

11. Application du procédé selon la revendication 10, à la mise en œuvre d'un procédé d'adaptation des plantes à un stress abiotique, tel que l'adaptation au froid, ou à un stress hydrique tel que la sécheresse, l'humidité ou la salinité.

25

12. Procédé de stimulation de la production de la phospholipase D chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé défini dans l'une des revendications 1 à 9, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

30

13. Application du procédé selon la revendication 12, à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la floraison, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle de

l'induction florale, de la durée de la floraison, et de l'abscission des fleurs, et/ou à la mise en œuvre d'un procédé de contrôle de la fructification des plantes, et plus particulièrement d'un procédé de contrôle du déclenchement et de la durée de la maturation des fruits, de l'abscission des feuilles et des fruits.

5

14. Procédé de stimulation de la production des glycosylhydrolases chez les plantes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de traitement des plantes avec au moins un composé défini dans l'une des revendications 1 à 9, notamment par irrigation du sol sur lequel ces plantes sont cultivées, avec une composition comprenant ledit composé, ou par enrobage des semences avec une telle composition, ou par pulvérisation foliaire en champ d'une telle composition sur les plantes à traiter.

10

15. Application du procédé selon la revendication 14, à la mise en œuvre d'un procédé d'induction de réactions de défense contre les pathogènes tels que les bactéries, virus, champignons.

15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR 03/00969A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A01N43/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A01N C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 02 26037 A (LIENART YVETTE ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)) 4 April 2002 (2002-04-04) claims ---	1-15
X	OZERETSKOVSKAYA O L ET AL: "OLIGOSACCHARINS AS REGULATORY MOLECULES OF PLANTS" RUSSIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, MOSCOW, RU, vol. 43, no. 5, 1996, pages 648-655, XP002061729 ISSN: 1021-4437 page 650, right-hand column, paragraph 4 -page 651, right-hand column, last paragraph --- -/-	1-15

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

27 August 2003

Date of mailing of the International search report

04/09/2003

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 91 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Decorte, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR 03/00969

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 00025 A (CENTRAL NAT DE LA RECH SCIENT ;HEYRAUD ALAIN (FR); LIENART YVETTE) 4 January 2001 (2001-01-04) -----	
A	US 5 602 111 A (YAMATOYA KAZUHIKO ET AL) 11 February 1997 (1997-02-11) -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/00969

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0226037	A 04-04-2002	FR AU CA WO	2814471 A1 9200901 A 2424819 A1 0226037 A2	29-03-2002 08-04-2002 04-04-2002 04-04-2002
WO 0100025	A 04-01-2001	FR AU CA EP WO JP	2795289 A1 6287800 A 2375941 A1 1189509 A1 0100025 A1 2003503322 T	29-12-2000 31-01-2001 04-01-2001 27-03-2002 04-01-2001 28-01-2003
US 5602111	A 11-02-1997	JP JP	3386489 B2 5331016 A	17-03-2003 14-12-1993

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/00969

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A01N43/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A01N C08B

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X, P	WO 02 26037 A (LIENART YVETTE ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)) 4 avril 2002 (2002-04-04) revendications ---	1-15
X	OZERETSKOVSKAYA O L ET AL: "OLIGOSACCHARINS AS REGULATORY MOLECULES OF PLANTS" RUSSIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, MOSCOW, RU, vol. 43, no. 5, 1996, pages 648-655, XP002061729 ISSN: 1021-4437 page 650, colonne de droite, alinéa 4 -page 651, colonne de droite, dernier alinéa --- -/-	1-15

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 août 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/09/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Decorte, D

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**Demande nationale No  
PCT/FR 03/00969**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01 00025 A (CENTRAL NAT DE LA RECH SCIENT ;HEYRAUD ALAIN (FR); LIENART YVETTE) 4 janvier 2001 (2001-01-04) -----	
A	US 5 602 111 A (YAMATOYA KAZUHIKO ET AL) 11 février 1997 (1997-02-11) -----	

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande internationale No  
PCT/FR 03/00969

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication		Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 0226037	A	04-04-2002	FR AU CA WO	2814471 A1 9200901 A 2424819 A1 0226037 A2	29-03-2002 08-04-2002 04-04-2002 04-04-2002
WO 0100025	A	04-01-2001	FR AU CA EP WO JP	2795289 A1 6287800 A 2375941 A1 1189509 A1 0100025 A1 2003503322 T	29-12-2000 31-01-2001 04-01-2001 27-03-2002 04-01-2001 28-01-2003
US 5602111	A	11-02-1997	JP JP	3386489 B2 5331016 A	17-03-2003 14-12-1993